

Bacteriologie

Osmotische druk: hypotoon milieu: water in bacterie → elastische cytoplasmatische membraan tegen peptidoglycaanlaag, beschermt tegen barsten celwand → gram+ bacteriën kunnen beter tegen hypotoon milieu.

Plasmolyse = krimpen van cytoplasmatisch membraan doordat water uit bacterie stroomt (hypertoon milieu).

Halofielen = groeien enkel bij hoge (10-20%) zoutconcentratie, geen peptidoglycaanlaag → barsten bij <10% NaCl.

Halotolerant = kunnen groeien bij hoge [NaCl], maar groeien beter bij normale (0,9%) [NaCl].

Residente flora = niet door wassen van huid verwijderd. Resistent aan droogte en hoge [NaCl] → vnl. gram+ kokken. In talgklieren *Propionibacterium acnes*: prod. propionzuur → ↓pH huid = bacteriostatisch effect pathogene kiemen.

Transiënte flora = afspiegeling contact huid met omgeving, makkelijk afgewassen.

Factoren die kleuringsproces beïnvloeden = T°, [kleurstof], aanwezigheid van bijtende stoffen/solventen, inwerking van zuren.

Fixeren: kiemen gedood, protoplasma coaguleert, cellen hechten aan draagglasje.

Enkelvoudige kleuringen: alles 1 kleur, maar verschillende affiniteit.

Differentiële kleuringen: mengsel van kleurstoffen, structuren nemen kleur op waar ze grootste affiniteit voor hebben, bv. Giemsa.

Metachromatische kleuringen: 1 kleurstof geeft afh. van substraat dezelfde of een andere kleur aan de initiële kleur van de kleurstof.

Vitale kleuringen: op niet-gefixeerde preparaten, levende structuren nemen selectief kleurstoffen op; negatieve kleuring = als alleen achtergrond is gekleurd.

Gram- kleuring: + = paars, - = roze.

- 1) algemene kleurstof (kristalviolet), kleurt alle bacteriën paars, hecht aan negatief geladen groepen
- 2) kleurfixerende kleurstof (lugol), vorming kristalviolet-joodcomplex (CV-I)
- 3) ontkleurder (alcohol-aceton), CV-I bij sommige bacteriën weggewassen
- 4) contrasterende kleurstof (safranine), hecht negatief geladen groepen, kleurt ontcleurde bacteriën roze.

Gram+ bacteriën houden CV-I vast door hun dikkere peptidoglycaanlaag. Gram- bacteriën hebben band van lipopolysacchariden en dunnere peptidoglycaanlaag die kleurcomplex niet kan vasthouden.

Cultuur = voedingsbodem/kweekmedium met daarop/-in gegroeide kiemen, rein ↔ meng.

Basiselementen voedingsbodems: N-bron (peptonen van eiwitten melk of vlees), C- en energiebron (vergiftbaar koolhydraat, meestal 0,5% glucose), S- en P-bron (resp. aminozuren en organische extracten), Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cl⁻ (als zouten), H₂O (>90%), agar (alleen vaste bodems!, inerte polysaccharideketens), bufferoplossingen (ivm. zure afbraakproducten).

Verder nog: groeifactoren (gistextract, bloed/serum, enzymen, ...), selectieve inhibitoren → slechts 1/enkele soorten groeien (kristalviolet, galzouten (remmen gram+), natriumazide (remt gram-)), pH-indicatoren (fenolrood, neutraal rood).

Algemene voedingsbodems:

TSA (tryptic soy agar): pH 7,3, alle ingrediënten om meeste micro-organismen te laten groeien, geen identificatie mogelijk.	tryptone sojameel peptone NaCl agar	17,0 g/l 5,0 5,0 12,0
TSB (tryptic soy broth): pH 7,3, alle ingrediënten om meeste micro-organismen te laten groeien, geen identificatie mogelijk, vloeibare tegenhanger TSA.	caseïne tryptone sojameel peptone NaCl diKwaterstof dextrose	17,0 g/l 3,0 5,0 2,5 2,5

Verrijkte voedingsbodems:

TSA SB/BA (bloedagar): adhv. hemolysepatronen onderverdeling streptokokken: α: gedeeltelijke, groene verkleuring door oxydatie Hb → metHb β: volledige, heldere zone errond γ: geen	tryptone sojameel peptone NaCl agar <u>schapenbloed</u>	17,0 g/l 5,0 5,0 12,0 5%
---	---	--------------------------------------

Selectieve voedingsbodems:

<u>Cet</u> (cetrimide agar): pH 7,2, voor isolatie en differentiatie <i>Pseudomonas</i> , cetyltrimethylammoniumbromide (antisepticum) inhibeert groei overige kiemen, blauwgroen (fluogeel).	peptone (gelatine) MgCl kaliumsulfaat <u>Cetrimide</u> agar glycerol	20,0 g/l 1,4 10,0 0,3 13,6 10 ml
<u>McC</u> (MacConkey agar): pH 7,1, matig selectief voor gram-bacteriën, galzouten en kristalviolet inhiberen gram+, bacteriën die lactose omzetten zijn rood en omgeven door troebele zone (door ↓pH en precipitatie galzouten) (bv. <i>E. coli</i>).	peptone (caseïne) peptone (vlees) NaCl <u>lactose</u> <u>galzouten</u> <u>neutraal rood</u> <u>kristalviolet</u> agar	17,0 g/l 3,0 5,0 10,0 1,5 0,03 0,001 13,5
<u>MSA</u> (mannitol salt phenol-red agar): pH 7,4, voor opsporen stafylokokken, hoge [NaCl] remt alles mv. halofielen, halotoleranten, microkokken, hiervan zet enkel <i>Stafylococcus aureus</i> mannitol om in zuur → geel.	peptones vleesextract NaCl <u>mannitol</u> <u>fenolrood</u> agar	10,0 g/l 1,0 <u>75,0</u> 10,0 0,025 12,0
<u>Nick</u> (Nickerson agar): pH 6,5, voor isolatie gisten (<i>Candida</i>), andere micro-organismen geïnhibeerd door bismuthsulfaat, bruin-zwarte kolonies.	gistextract sojameel peptone glycine D-glucose <u>bismuthsulfaat</u> <u>indicator</u> agar	1,0 g/l 2,0 10,0 10,0 2,0 15,0
<u>SAB</u> (sabouraud (dextrose) glucose agar): pH 5,0-5,6, isolatie gisten en schimmels door hoge [suiker] en lage pH, uitsluiting bacteriën door toevoegen AB, geen verdere identificatie mogelijk.	peptone <u>glucose</u> agar	10,0 g/l <u>40,0</u> 15,0

Selectieve voedingsbodems:

ureum milieu: bij splitsing ureum door bacteriële ureasen slaat lichtbruine milieu om naar paarsblauw.

Identificatie micro-organismen obv.:

- morfologie (uitzicht celcultuur, microscopische beelden)
- fysische groeivoorwaarden (O₂, T°, voedingsstoffen)
- biochemische eigenschappen (mbv. "arme voedingsbodem" om metabole eigenschappen na te gaan, verschillende testen in API-identificatiesysteem)
 - katalasetest: katalase = hemoproteïne dat Fe³⁺ bevat als reactief bestanddeel, micro-organismen gebruiken het om H₂O₂, dat gevormd wordt tijdens aerobe afbraak van suikers, te neutraliseren.
 $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2 \uparrow$ (bubbeltjes)
(stafylokokken + / streptokokken -)
 - oxidasetest: kan meerdere substraten oxideren, meestal 1 gekozen dat kleurstof vormt.
dimethyl-p-fenyleendiamine → *indo-fenolblauw* (*blauwzwart*)
(enterobacteriaceae - / niet-entero +)

Breedspectrum AB: gram+ en gram-.

Smalspectrum: tegen sommige gram+ of gram-.

MIC = minimum inhiberende concentratie = laagste concentratie AB die groeiremmend werkt.

MBC = minimum bactericide concentratie.

Persisterende bacteriën = ontsnapt aan AB, kunnen later terug groeien.

Werking AB: competitie, remming celwandsynthese, remming eiwitsynthese, interferentie nucleïnezuursynthese.

Combinatie AB: synergisme, indifferentie, antagonisme.

Werking AB - kwalitatief: antibiogram
- kwantitatief: MIC, MBC.

Antiseptica/desinfectantia werking: interactie met gehele cel, celwand (lyse), cytoplasmatisch membraan (veranderingen permeabiliteit), cytoplasma (irreversiebele coagulatie/denaturatie).
Reductiefactor = $\log(\text{initiële kiemgetal } (10^x) / \text{kiemgetal na behandeling } (10^y))$.

CFU's tellen / # ml uitgeplaat * ml totale suspensie.

Celcultuur

MEM = minimaal essentieel medium: HCO_3^- -buffer, AZ (L-glutamine), vitaminen, sporenelementen, fenolrood.

Trypsine: enzymatisch losmaken cellen.

iFCS: voor inactiveren trypsin (bevat α -macroglobuline).

Trypaanblauw: opgenomen door cellen, levende cellen werken het actief naar buiten, dode blijven blauw.

PBS: iFCS weggewassen.

Resazurine \rightarrow resorufine door levende cellen (blauw \rightarrow fluo roze).

EDTA = Ca^{2+} chelator.

Paardenserum: achtergrondblokkage.

Cellen tellen: totaal in 4 kwadranten / 4 * verdunning * 10.000 ($\text{mm}^2 \rightarrow \text{ml}$).

Berekening cellen/well: totaal # cellen/ml, 40 wells à 200 μl = 8 ml + 2 ml reserve = 10 ml nodig.

10 ml à 30.000 cellen/well $\approx 1,5 \cdot 10^6$ cellen/10 ml

$40 \cdot 30.000 = 1,2 \cdot 10^6 = \#$ cellen totaal nodig, zit in 8 ml

$1,2 \cdot 10^6 / 8 \cdot 10 = \#$ aantal cellen in 10 ml = $1,5 \cdot 10^6$

totaal # cellen / $1,5 \cdot 10^6 = \text{factor}$

1 ml / factor = μl van celsuspensie, aanlengen tot 10 ml.